

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5592439号
(P5592439)

(45) 発行日 平成26年9月17日(2014.9.17)

(24) 登録日 平成26年8月8日(2014.8.8)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 35/74 (2006.01) A 6 1 K 35/74 A
A 6 1 P 3/04 (2006.01) A 6 1 K 35/74 G
 A 6 1 P 3/04

請求項の数 1 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2012-133619 (P2012-133619)	(73) 特許権者	711002926
(22) 出願日	平成24年6月13日(2012.6.13)		雪印メグミルク株式会社
(62) 分割の表示	特願2009-168420 (P2009-168420) の分割		北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号
原出願日	平成14年3月4日(2002.3.4)	(74) 代理人	110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所
(65) 公開番号	特開2012-180373 (P2012-180373A)	(72) 発明者	藤原 茂 埼玉県所鶴ヶ島市脚折1385-34
(43) 公開日	平成24年9月20日(2012.9.20)	(72) 発明者	瀬戸 泰幸 埼玉県川越市野田町1-13-22 相原 マンション306
審査請求日	平成24年6月13日(2012.6.13)	(72) 発明者	手島 珠紀 埼玉県川越市小仙波町5-8-15 エス ペランサB-101
微生物の受託番号	IPOD FERM P-10657		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 加齢に伴う代謝異常疾患の予防・改善・治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ビフィドバクテリウム・ロンガム(Bifidobacterium longum) SBT2928 (以下BL2928という) (FERM P-10657) を培養して得られる発酵物を有効成分とする、脂肪蓄積低下剤(ただし、飲食品の態様を除く)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、加齢に伴って発生する代謝異常症の予防・改善・治療剤及び/または加齢に伴って発生する代謝異常症の予防・改善・治療作用を有する飲食品に関する。

【背景技術】

【0002】

老化は生物にとって避けることのできない生命現象である。老化の原因として種々の要因が仮説として挙げられている。例えば、細胞レベルではプログラム説や、エラー破綻説等がある。いずれの説をとっても、細胞内に生じた老化機構による変化が生体全般の老化現象にどのような形で関連しているか不明である。しかし、それらの変化が中枢的な細胞群で生じ、全般に波及効果を及ぼすという考え方や、末梢的に個々の細胞で生じた変化が影響し合って全般的に老化現象に反映するという考え方もある。これらの変化を老化という現象の指標とするために種々の指標が提案されているが、まだ確定的な指標はない。

近年、加齢に伴って発生する種々の代謝障害、代謝異常症、あるいは機能障害を改善す

ることで、寿命の延長が実現され、ひいては種々の老化指標が低下するといわれている。欧米化された食生活の定着に伴い、加齢に伴う日本人の代謝異常の性格は変化している。

【 0 0 0 3 】

近年特に問題となっている、加齢にともなって発生する代謝異常が原因と考えられる各種疾患としては、肥満による高脂血症・脳内アミロイド蓄積を伴う老人性痴呆・免疫異常・腸管機能低下・腸内微生物の交代に由来する大腸がん・尿毒症などの腎臓機能障害等である。

肥満には種々の原因が挙げられるが、食餌療法や運動療法以上の効果を示す抜本的な治療策は見出されていない。これまで食餌療法以外に加齢に伴う体脂肪の蓄積抑制剤としては、バラ科植物の果実又はエッセンスを投与する方法(特許文献1)、そば粉由来の組成物を投与する方法(特許文献2)、プロシアニジン投与する方法(特許文献3)、冬瓜果皮と茄子果皮を投与する方法(特許文献4)、特定の脂肪酸を投与してエネルギー代謝効率を変える方法(特許文献5)等さまざまな方法や剤が提案されている。しかし、本発明で以下に説明する腸内定着性を有するビフィドバクテリウム・ロンガムによる脂肪蓄積を抑制させるような提案はない。

老人性痴呆には脳血管性痴呆とアルツハイマー型痴呆の2タイプがあるが、特に近年になり脳内アミロイドの蓄積(アミロイドーシス)を伴うアルツハイマー型痴呆の発生が増加している。アミロイドの蓄積(アミロイドーシス)を抑制する物質としては、アミロイド蛋白質を投与する方法(特許文献6)、アミロイド蛋白質の断片を投与する方法(特許文献7)、アニオンで置換された特定構造を有する糖組成物を投与する方法(特許文献8)等が提案されている。しかし、本発明で以下に説明する腸内定着性を有するビフィドバクテリウム・ロンガムによる脳内アミロイド蓄積を抑制させるような提案はない。

【 0 0 0 4 】

加齢に伴う腎臓機能の低下は、老化による糸球体の機能低下やメサンジウム細胞の機能低下、あるいは老廃物・IgAの蓄積など種々の原因が挙げられている。加齢に伴う腎臓機能の低下を抑制するために、IGF-1またはIGF-3を投与する方法、IPレセプター作動薬を投与する方法(特許文献9)等、新規な治療剤や治療方法が提案されている。しかし、本発明で以下に説明する腸内定着性を有するビフィドバクテリウム・ロンガムによる腎臓機能や代謝の低下を抑制させるような提案はない。

上記の疾患はいずれも高齢者の思考や行動を大幅に制限するものであり、その結果、高齢者の生活の質(クオリティー・オブ・ライフ:QOL)を低下させている。

これらの疾患の症状を改善するための治療薬は種々提案され、実用化されているが、高齢者のQOLを抜本的に改善するものではない。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【特許文献1】特開平8 - 198768号公報

【特許文献2】特開平9 - 183735号公報

【特許文献3】特開平9 - 291039号公報

【特許文献4】特開平11 - 164668号公報

【特許文献5】特開2001 - 286268号公報

【特許文献6】特表平6 - 502387号公報

【特許文献7】特表平11 - 500462号公報

【特許文献8】特表2001 - 513569号公報

【特許文献9】特開2000 - 191523号公報

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

本発明者らは、ヒト腸管内に定着性を有する乳酸菌の研究を行っていたところ、腸管内定着性を有する乳酸菌、特にビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)

)に属する乳酸菌を培養して得られる培養物及び/または菌体を投与すると、これらの微生物は腸管内に定着することによって宿主に作用し、実験動物においては顕著な寿命延長をもたらすことを見出した。さらに研究を進めた結果、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)を加齢動物に投与すると、腸管内に定着したビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)が宿主に作用して、加齢に伴う代謝異常を改善し、腎臓機能の低下や悪化を抑制し、肥満の原因となる脂質代謝を改善し、さらに脳内アミロイドの蓄積を抑制するという驚くべき効果を有することを見出した。その結果、加齢に伴うQOLは明らかに向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

従って本発明は、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)に属する乳酸菌を培養して得られる培養物及び/または菌体を有効成分とする代謝異常症の予防・改善・治療剤を提供することを課題とする。

10

さらに本発明は、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)に属する乳酸菌を培養して得られる培養物及び/または菌体を含有することによる加齢に伴う代謝異常症の予防・改善・治療作用を有する飲食品を提供することを課題とする。

【0007】

本発明者らは、従来から種々の発酵乳の研究を行っていたところ、これらの発酵乳から分離された乳酸菌やヒト由来の乳酸菌の中で特にビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)が従来に見られない高いヒト腸管内定着性を有していることを見出し、さらにこのビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)が、従来知られていなかった腸管定着性によって加齢に伴う代謝異常を改善し、腎臓機能の低下や悪化を抑制し、肥満の原因となる脂質代謝を改善し、さらに脳内アミロイドの蓄積を抑制することを見出し、上記課題の解決に成功した。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)に属する乳酸菌を培養して得られる培養物及び/または菌体を有効成分とする加齢に伴う代謝異常症の予防・改善・治療剤に関する。

また本発明は、このような有効成分を含有してなる加齢に伴う代謝異常症の予防・改善・治療作用を有する飲食品に関する。即ち本発明は、特許請求範囲に記載した下記の構成からなる発明である。

30

【0009】

(1) ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)に属する乳酸菌を培養して得られる培養物及び/または菌体を有効成分とする代謝異常症の予防・改善・治療剤。

(2) ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)に属する乳酸菌が、ヒト腸管内定着性を有するビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)である(1)記載の代謝異常症の予防・改善・治療剤。

(3) 代謝異常症が腎臓機能異常症、脳内アミロイドーシス、脂質代謝異常症のいずれかである(1)または(2)記載の代謝異常症の予防・改善・治療剤。

(4) ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)に属する乳酸菌を培養して得られる培養物が発酵乳である(1)~(3)のいずれかに記載の代謝異常症の予防・改善・治療剤。

40

(5) ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)に属する乳酸菌がビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)・SBT2928 (FERM P-10657)である(1)~(4)のいずれかに記載の代謝異常症の予防・改善・治療剤。

(6) ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)に属する乳酸菌を培養して得られる培養物及び/または菌体を添加した代謝異常症の予防・改善・治療作用を有する飲食品。

【発明の効果】

【0010】

50

本発明によれば、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) に属する乳酸菌を培養して得られる培養物及び/または菌体を有効成分とする代謝異常症の予防・改善・治療剤と代謝異常症の予防・改善・治療作用を有する飲食品を提供することができる。

本発明によって提供される代謝異常症予防・改善・治療剤は、毒性及び副作用が極めて少なく、また、食品素材としても有用である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】実験動物の寿命を示す。

【図2】糞便内ビフィドバクテリウム数を示す。

10

【図3】糞便内クロストリディウム数を示す。

【図4】尿排泄量の変化を示す。

【図5】尿排泄量の変化を示す。

【図6】尿中8-OHdG排泄量を示す。

【図7】脳内アミロイドの蓄積量を示す。

【図8】体重と後腹壁脂肪重量の相関を示す。

【図9】動物の自立起立運動測定結果を示す。

【図10】ヘルパーT細胞構成比率を示す。

【図11】盲腸内pHを示す。

【図12】糞便内IgAの変動値を示す。

20

【図13】飼料効率を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、上記した課題を解決するためになされたものであって、本発明者らは、目的とする乳酸菌をスクリーニングするに際し、次のような基準を新たに設定し目的に合致する株を選定した。すなわち、本発明者らは、発酵乳やヒト由来の数多くのビフィドバクテリウム・ロンガムのうち、胃酸耐性が高い、低pH条件下での生育が良好である、ヒト腸管へ高い定着性を示す、ヒト腸管細胞親和性を示す、胆汁酸耐性がある、腸管内に定着することによって加齢に伴う種々の代謝異常を予防・改善・治療する効果を有する、食品に適用した際に生残性が高く、香味、物性も優れている等々の条件を設定し、菌株の選定につき鋭意研究を重ねた。本条件によってスクリーニングした結果、これらの条件に合致する菌株として以下菌株を選択することができた。なお、この菌株は、下記の寄託番号により独立行政法人産業技術総合研究所 特許微生物寄託センターに寄託されている。

30

【0013】

菌株

ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)

SBT2928 FERM P-10657

この菌株は、ヒト腸管細胞に高い親和性を有し、経口で投与した時、生存して腸管内に到達することができ長期間腸管内に常在することが可能であり、腸管内生育することで宿主に作用し加齢に伴う代謝異常を予防・改善・治療する。体外から投与したビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) に属する乳酸菌が腸内に定着し、このような生理効果を示すことは全く知られておらず、本発明者らによって始めて明らかにされた。

40

【0014】

さらに本発明では、上記寄託菌株に限らず、ヒトや発酵乳から分離されるビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) であって、上記の作用を示すものであれば、いずれのものでも使用できる。

次に、これらの乳酸菌の培養方法を記す。

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) の培地には、乳培地または乳成分を含む培地、これを含まない半合成培地等、種々の培地を用いることが

50

できる。このような培地としては、脱脂乳を還元して加熱殺菌した還元脱脂乳培地を例示することができる。

培養法は、静置培養またはpHを一定にコントロールした中和培養で行うが、菌が良好に生育する条件であれば特に培養法に制限はない。

【0015】

本発明は、上述のようにして得られる培養物及び/または菌体を有効成分とする。また、乾燥した粉末を有効成分としてもよい。これらの乾燥は凍結乾燥で行なうことが菌体を変質させることなく乾燥することができるので好ましい。

これらの有効成分は経口摂取することが望ましい。また、これらの粉末は乳糖等の適当な賦形剤と混合し、粉剤、錠剤、丸剤、カプセル剤または粒剤等として経口投与することができる。投与量は、投与対象者の症状、年齢等を考慮してそれぞれ個別に適宜決定されるが、通常成人1日当たり乾燥物として0.5~10gであり、これを1日数回に分けて投与するとよい。特に好ましくは、それぞれの株を生菌として、成人一人当たり $10^8 \sim 10^{12}$ cfu/日投与することで本発明の目的とする効果を発揮させることが可能となる。このようにして摂取することによって腸管内に定着し所望の効果を発揮する。

【0016】

また、本発明の有効成分は、飲食品の製造工程中に原料に添加してもよい。飲食品としてはどのような飲食品でもよく、その例として、乳飲料、醗酵乳、果汁飲料、ゼリー、キャンディー、乳製品、マヨネーズ等の卵加工品、バターケーキ等の菓子パン類等の食品を挙げることができる。但し、本発明の特性として乳酸菌が生存した状態で腸管に定着することが必要であり、過度の加熱は避けることが好ましい。また、マイクロカプセル等の従来技術を採用して、加熱を避ける手段を講じてもよい。

さらにまた、本発明における飲食品は、前述したビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) の菌株を使用して乳酸発酵を行なって製造されたヨーグルト等であってもよい。

以下に、本発明に用いる乳酸菌株として、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)・SBT2928 (BL2928) 株を用いた試験例を示し、菌学的性質及びインビトロ、インビボによる効果を具体的に説明する。しかし、本発明はこの記載内容に限定されるものではない。

【0017】

[試験例]

BL2928株の性状

1. 菌学的性状

(1) 菌形

BL血液寒天平板培地を用いて37、48時間嫌気培養後の結果を示す。

形状：桿菌

大きさ：0.5-1×3-4 μm

連鎖したものの多数

(2) グラム染色性 陽性

(3) コロニー形態

形状：円形

周縁：滑状

大きさ：直径2-3 mm

色調：茶色

表面：円滑

(4) 芽胞形成 陰性

(5) ガス産生 なし

(6) 運動性 なし

(7) カタラーゼ活性 陰性

(8) 脱脂乳凝固性 凝固

- (9)ゼラチン液化性 なし
 (1 0)硝酸塩還元性 なし
 (1 1)インドール産性 なし
 (1 2)硫化水素産性 なし

【 0 0 1 8 】

2 . 糖の発酵性

市販の細菌同定用キット（アピ50CH、バイオメリュー社）にて糖の発酵性を検討した結果を以下に記載する。

L-アラビノース +

L-リボース +

ソルビトール -

セロビオース -

ラクトース +

メレジトース +

ラフィノース +

スターチ -

グルコネート -

(+ は発酵性有りを示し、 - は発酵性なしを示す。)

【 0 0 1 9 】

上記の分類学的性状と糖の発酵性は、典型的なビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) の性状を示した。

【 0 0 2 0 】

次いで、以下の通りDNA相同性試験による確認試験を実施した。

DNA相同性試験

以下に記載したビフィドバクテリウムの基準株、被験菌BL2928株、そしてコントロールとして大腸菌 (*Escherichia. coli*) のDNAを抽出、精製した。

被験菌： BL2928株

基準株： ビフィドバクテリウム・ロンガムJCM1217株

ビフィドバクテリウム・インファンティスJCM1222株

ビフィドバクテリウム・ピフィダムJCM1255株

ビフィドバクテリウム・ブレベJCM1192株

ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスJCM1275株

ビフィドバクテリウム・アニマリスJCM1190株

大腸菌 (*Escherichia. coli*)

BL2928株のDNA同士との相同性を100%、BL2928株と大腸菌とのDNA相同性を0%としたときの、BL2928株と各基準株のDNA相同性をDNAハイブリダイゼーション法により検討した。その結果、BL 2928株はビフィドバクテリウム・ロンガム基準株と90%以上の相同性を有していたため、BL2928株はビフィドバクテリウム・ロンガムと同定した。

【 0 0 2 1 】

胃酸耐性

胃酸耐性試験は瀧口らの方法（腸内細菌学雑誌 14.11-18.2000）に従ってpH2.0の人工胃液を調製し胃酸耐性試験を行ったところBL2928株は3時間以上生存した。

【 0 0 2 2 】

人工腸液耐性

瀧口らの方法（腸内細菌学雑誌 14.11-18.2000）に従って胆汁末を含む人工腸液を調製し、これに前記の人工胃液処理を行ったBL2928株を加えて耐性を試験したところ、20時間以上の生存性を示した。BL2928株は、消化管を通過し、大腸まで生存して到達することが確認された。

【 0 0 2 3 】

ヒトの腸管通過能と腸内定着性

10

20

30

40

50

無脂乳固形9.5%、乳脂肪3.0%の乳にBL2928株のスターターを4%接種して39℃で4時間醗酵させた醗酵乳を健康な成人ボランティア42名に4週間、毎日100gを1日1回食させて腸内菌の変化を観察した。試験期間中は腸内菌に影響のある食品やオリゴ糖、薬品の摂取を禁ずる以外は自由に食事をさせて評価を行った。試験前は検出されなかったBL2928株がすべての被験者から4週間後には検出され、同株が高い腸管内定着性を有することがわかった。

【0024】

動物試験

A. インビボでの実験動物の寿命に与える影響試験

1. 乳酸菌脱脂乳培養の調製

BL2928株を用いた。乳酸菌は、115℃、20分間の滅菌処理をした0.5%酵母エキス（アサヒビール食品社製）添加11.55%脱脂乳培地にて、37℃、16時間培養した。得られた培養物は凍結乾燥後、乳鉢で粉碎した。

【0025】

2. 試験飼料の調製

表1にAIN-93M（オリエンタル酵母工業社製）に準拠した食餌組成を示した。この飼料に5%脱脂乳または上記脱脂乳乳酸菌培養物を添加した。

【0026】

【表1】

食餌組成

AIN-93M	(%)
カゼイン	14.0000
L-シスチン	0.1800
コーンスターチ	46.5692
α化コーンスターチ	15.5000
シュクロース	10.0000
大豆油	4.0000
セルロースパウダー	5.0000
AIN93-M ミネラル混合	3.5000
AIN-93 ビタミン混合	1.0000
重酒石酸コリン	0.2500
第三ブチルヒドロキノン	0.0008

【0027】

3. 試験動物

5週齢の老化促進モデルであるSenescence-Accelerated Mouse (SAM) P8系雌マウス（日本SLC社より入手）を2群、各群30匹とした。AIN-93Mにて1週間予備飼育後、上記の試験飼料で死亡するまで飼育した。この間、イオン交換水及び飼料（7gから8g以内）は自由摂取させた。

【0028】

4. 体重測定

飼育期間中、週1回体重を測定した。週齢から60週齢までの体重について分割区法による分散分析を行った。

【0029】

5. 食餌摂取量測定法

食餌摂取量は約4週間に1回測定した。あらかじめ秤量した飼料を与え、翌日同時間帯に容器中にある餌残量を測定し、1日当たりの食餌摂取量を算出した。

【0030】

6. フローラ解析

新鮮な糞便を採取し、「嫌気性菌の分離と同定法」（菜根出版）に記載されている光岡らの方法に準拠し、5週齢（初発値）、3ヶ月齢、5ヶ月齢、7ヶ月齢、10ヶ月齢、さらに12ヶ月齢において、腸内フローラ解析を行った。得られたデータについては、分割区法

10

20

30

40

50

による分散分析を行った。

【 0 0 3 1 】

B. 老化指標に与える影響についての試験 (40週齢時の生体機能)

1. 乳酸菌脱脂乳培養の調製

前記Aと同様にBL2928株を用いた。乳酸菌は、115、20分間の滅菌処理をした0.5%酵母エキス(アサヒビール食品社製)添加11.55%脱脂乳培地にて、37、16時間培養した。得られた培養物は凍結乾燥後、乳鉢で粉碎した。

【 0 0 3 2 】

2. 試験飼料

前記と同様にAIN-93M(オリエンタル酵母工業社製)に準拠した食餌を調整し、この飼料に5%脱脂乳または上記脱脂乳乳酸菌培養物を添加した。

10

【 0 0 3 3 】

3. 実験動物

5週齢のSAM P8系雌マウス(日本SLC社より入手)を2群、各群10匹として用いた。AIN-93Mにて1週間予備飼育後、上記の試験飼料で36週飼育した。この間、イオン交換水及び飼料は自由摂取させた。40週齢まで飼育した後、約16時間絶食させ、ネンプター(大日本製薬社製)麻酔下に開腹し、下大静脈採血によって屠殺した。

【 0 0 3 4 】

4. 体重測定

飼育期間中、週1回体重を測定した。得られたデータについては、分割区法による分散分析を行った。

20

【 0 0 3 5 】

5. 食餌摂取量測定法

食餌摂取量の測定は、幼若時においては毎週、後に約1ヶ月に1回(1週)の割合で測定した。予め秤量した飼料を与え、翌日同時間帯に容器中にある餌残量を測定し、1日当たりの食餌摂取量を算出した。

【 0 0 3 6 】

6. 代謝ケージ

飼育期間中、4回代謝ケージにて飼育し、採尿、採糞を行った。代謝ケージでの飼育は、14週、22週、29週及び38週齢において行った。2日間の慣らし飼育の後、3日目から4日目にかけて約24時間、糞便ならびに尿を採取した。期間中は、飲料水、飼料摂取量ならびに体重もモニターした。

30

【 0 0 3 7 】

7. 尿8-ヒドロキシデオキシグアノシンの測定

代謝ケージ飼育にて得られた尿について、8-OHdG測定用ELISAキット(日本老化制御研究所製)を用いて測定した。

【 0 0 3 8 】

8. 脳内アミロイド蓄積量の測定

屠殺直後に解剖し、大脳を摘出した。得られた大脳をプロテインインヒビターミクスチャー(SIGMA社製)0.5%添加PBSを用い、テフロン(登録商標)ホモジナイザーにて均質化し、アミロイドベータ(1-42)測定キット(免疫生物研究所製)を用いて測定した。

40

【 0 0 3 9 】

9. 後腹壁脂肪重量

屠殺直後に解剖し、後腹壁脂肪を左右各々摘出し、精密天秤METTLER AE240(日本シベルヘグナー社製)にて重量を測定した。

【 0 0 4 0 】

10. 起立運動ならびに自発運動測定法

40週齢において、マウスの自発運動ならびに起立運動を測定した。30分間におけるコイル間移動回数、ならびに起立回数を計測した。計測には、実験動物運動量測定装置(室町機械社製)を用いた。

50

【 0 0 4 1 】

1 1 . 血漿分析

約16時間絶食させた後、ネンブータル麻酔下にて、下大静脈から全採血後、抗凝固剤処理（ヘパリン10単位/ml）後、遠心分離により血漿を得た。その後、生化学自動分析装置FDC5500（富士フィルムメディカル社製）を用いて測定した。

【 0 0 4 2 】

1 2 . 糞便中IgAの測定

代謝ケージ飼育にて得られた糞便について、遠心エバポレーター-CVE-200D（EYELA社製）にて乾燥した後、重量を測定し、プロテインインヒビター（SIGMA社製）0.5%添加PBSを加え、糞便を0.05g/ml濃度に分散し、ホモジナイザー（池本理化工業社製）にて均質化した。この分散液を、4、15,000rpmにて10分間遠心し、上清をマウスIgA測定に供した。マウスIgA測定用ELISAキット（BETHYL社製）を用いて測定した。

10

【 0 0 4 3 】

1 3 . 血球分析

マウスを約16時間絶食させた後、ネンブータル麻酔下、抗凝固剤処理（ヘパリン10単位/ml）をしたシリンジを用い、下大静脈から全採血後、全自動血球計数器MEK-6158（日本光電社製）を用いて測定した。

【 0 0 4 4 】

1 4 . Th1 / Th2細胞比の測定

脾臓を摘出したのち無菌的につぶし、25m MHEPES-RPMIを加えながら、脾臓細胞懸濁液を調製する。この脾臓細胞懸濁液を定法に従い、セルストレイナーを通して単細胞懸濁液とした。EPICS Application Note8の方法に従い、脾臓リンパ球の細胞表面CD3、細胞内IL4、細胞内INF-gammaの蛍光染色を行った。この後、フローサイトメーターCoulter EPICS XLにて解析を行い、CD3陽性細胞比、Th1 / Th2細胞比を算出した。

20

【 0 0 4 5 】

試験結果

A . インビボでの実験動物の寿命に与える影響についての試験結果

図1に、実験に用いたマウスの寿命を示した。コントロールに比べ、本発明の発酵乳（BL2928株）投与群は著しく生存期間を延長し、本発明が寿命延長に顕著な効果を示すことが明らかになった。

30

図2に、実験に用いたマウスの5週齢から60週にわたる体重変化を示した。本発明の発酵乳（BL2928株）投与群の体重増加がコントロールに比較して小さく、30週付近での体重の伸びが小さいことが確認された。

【 0 0 4 6 】

B . 老化指標に与える影響についての試験結果

表2に、12ヶ月齢に達するまでの腸内フローラの変化の解析結果を示した。本発明の発酵乳（BL2928株）投与による糞便内のビフィドバクテリウム属の有意な増加ならびにレンチナーゼ陰性クロストリディウム属の著しい減少を示した。両菌群共に時間依存性の変化が認められた。グループ毎にビフィドバクテリウム属の菌数の変化に相違が存在することが確認された。

40

【 0 0 4 7 】

【表 2】

菌 群	一次因子		二次因子	
	グループ	繰り返し (グループ)	時間	時間*グループ
Total count	0.0418	0.6032	0.2975	0.9461
Clostridium	0.0001	0.0017	0.0368	0.0001
Lactobacillus	0.7745	0.0001	0.0003	0.3110
Staphylococcus	0.4512	0.0009	0.0002	0.2755
Bacteroidaceae	0.4977	0.5273	0.0912	0.8756
Peptococcaceae	0.0074	0.1823	0.9753	0.0685
Enterococcus	0.4364	0.0001	0.7868	0.0868
Enterobacteriaceae	0.6199	0.0007	0.1422	0.0710
Eubacterium	0.1856	0.1307	0.0006	0.3180
Bifidobacterium	0.0001	0.2076	0.0028	0.0060
C.perfringens	N.A.			
Yeast	N.A.			
Fungi	N.A.			

【 0 0 4 8 】

図 3 に、糞便内ビフィドバクテリウム属の菌数の変化を示した。本発明の発酵乳 (BL2928株) 投与群では生活齢に伴ってビフィドバクテリウム属の菌数が増加することが明らかとなった。

図 4 に、糞便内クロストリディウム属の菌数の変化を示した。本発明の発酵乳 (BL2928株) 投与群ではクロストリディウム属の菌数が著しく低下することが明かとなった。

【 0 0 4 9 】

図 5 に、実験期間を通して観察した尿の排泄量の解析結果を示した。本発明の発酵乳 (BL2928株) 投与群では、尿の排泄量が増加した。

【 0 0 5 0 】

図 6 に、尿中に排泄される酸化マーカー (8-OHdG) の排泄量を示した。代謝の盛んな時期には両群とも排泄が盛んになるが、全試験期間を通して本発明の発酵乳 (BL2928株) 投与群の排泄量が高いことが明らかになった。

以上の尿排泄量と8-OHdG排泄量の測定結果から本発明の発酵乳 (BL2928株含有) を含有する発酵乳は加齢に伴う腎臓の機能低下を予防・改善することが明かとなった。

【 0 0 5 1 】

図 7 に、脳内アミロイド蓄積量の測定結果を示す。本発明の発酵乳 (BL2928株) 投与群において、加齢に伴うアミロイド蓄積の抑制が確認され、アミロイドーシスの予防・改善効果が確認できた。また、以下に示す起立運動試験の結果と合わせて痴呆症の予防・改善効果を確認することができた。

【 0 0 5 2 】

図 8 に、後腹壁脂肪蓄積量の比較結果を示す。本発明の発酵乳 (BL2928株) 投与群において、著しく低下することが確認され、加齢に伴う脂質代謝異常を改善することが明らかになった。

【 0 0 5 3 】

図 9 に、マウスの自発運動の観察結果を示す。コントロール群で異常な動きが確認され、本発明の発酵乳 (BL2928株) 投与群ではこのような異常行動は少なかった。本発明の発酵乳 (BL2928株含有) を投与することにより、脳内アミロイドの蓄積が低下し、加齢に伴う痴呆の抑制に効果があることが明らかになった。

【 0 0 5 4 】

表 3 に、血漿分析値をまとめて示した。本発明の発酵乳 (BL2928株) 投与群において、血漿コレステロール値の低下傾向が確認された。蓄積脂肪重量の低下と合わせて本発明の発酵乳 (BL2928株含有) により、加齢に伴う脂質代謝異常が改善されることが確認された。

【 0 0 5 5 】

【表 3】

	Creatinine	T-choI	BUN	Glucose (mg/dl)	HDL-Chol	UA	ALP	GPT-Corr	T-BIL	GGT-Corr	ALP
CBL	0.8708	0.1774	0.8234	0.8938	0.4424	0.0544	0.8543	0.7417	0.8567	0.7417	0.1532

【 0 0 5 6 】

図 1 0 に、脾臓ヘルパー T 細胞レパートリーの解析結果を示した。本発明の発酵乳 (BL 2928 株) 投与群において、細胞性免疫機能の活性化が生じていることが確認された。同時に脾臓内 CD3 陽性細胞比率 (T 細胞) も高くなっていることが確認された (P = 0.0842)。

【 0 0 5 7 】

図 1 1 に、盲腸内容物の pH の測定結果を示した。本発明の発酵乳 (BL2928 株) 投与群において、盲腸内容物の pH 低下が著しいことが確認された。

【 0 0 5 8 】

図 1 2 に、糞便 IgA の測定結果を示す。糞便 IgA の排泄量は、本発明の発酵乳 (BL2928 株) 投与群において高い傾向にあった。

【 0 0 5 9 】

図 1 3 に、試験期間を通した飼料効率を示す。本発明の発酵乳 (BL2928 株) 投与群の飼料効率が有意に高いことが確認された。一方、図 13 から加齢による飼料効率のマイナス化が抑制されていることが判明した。この結果は、「元気に生きてぽっくりなくなる」ことを立証するものであり、QOL の維持・改効果を確認することができた。

【 0 0 6 0 】

以下に実施例を示す。

【実施例】

【 0 0 6 1 】

1. 乾燥粉末

BL2928 株を 10% 還元脱脂乳培地 (121、10 分加熱) で培養し、本培養物を凍結乾燥し粉末化し、本発明の予防改善治療剤を調製した (A)。

【 0 0 6 2 】

2. 発酵乳

BL2928 株をブリッグス肝臓培地にて培養した。対数増殖期にある各培養液を、0.3% の酵母エキスを添加した 10% 還元脱脂乳 (115、20 分間滅菌) に 1% 接種し、個々マゼーカルチャーを作成した。

これをヨーグルトミックス (10% の還元脱脂乳を添加し、100 にて 10 分間加熱したもの) に各 2.5% 添加して調製した。発酵は 37 で行い、乳酸酸度 0.85 に到達した時点で冷却し、発酵を終了させ、本発明の予防改善治療作用を有する発酵乳を調製した (B)。

【 0 0 6 3 】

2. 製剤例 1

BL2928 株の液体培養物から対数増殖期にある菌体を、4、7,000 rpm で 15 分間遠心分離して滅菌水による洗浄を行い、これを 3 回繰り返して洗浄菌体を得た。これを凍結乾燥処理して菌体粉末を得た。この菌体粉末 1 部に脱脂乳 4 部を混合し、この粉末を打錠機により 1 g ずつ定法により打錠して、菌体 200mg を含む錠剤を調製した。また、上記の BL2928 株を含有する発酵乳を凍結乾燥し、得られた粉末を用いて直接打錠した。

【 0 0 6 4 】

4. カプセル化剤

凍結乾燥粉末を散剤化した後、造粒により顆粒状とした後、空カプセルに 10mg ずつ充填しカプセル剤とした。

【 0 0 6 5 】

5. 製剤例 2

BL2928 株を MRS 液体培地 (Difco 社製) 5 L に接種後、37、18 時間静置培養を行った。BL2928 株を脱脂乳 5 L に接種後、37、18 時間静置培養を行った。培養終了後、7,000rp

10

20

30

40

50

で15分間遠心分離を行い、培養液の1/50量のそれぞれの濃縮菌体を得た。次いで、この濃縮菌体を脱脂粉乳10%（重量）、グルタミン酸ソーダ1%（重量）を含む分散媒と同量混合し、pH7に調整後、凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥物を60メッシュのフルイで整粒化し、凍結乾燥菌末を得た。

第13改正日本薬局方解説書製剤総則「散剤」の規定に準拠し、上記5で得られた凍結乾燥菌末1gにラクトース（日局）400g、バレイシヨデンブ（日局）600gを加えて均一に混合し、散剤を製造した。

【0066】

6. 製剤例3

次の配合により抗潰瘍剤を製造し

10

- (1) BL2928株の脱脂粉乳培地における培養物の凍結乾燥物50g、
- (2) ラクトース90g、
- (3) コーンスターチ29g、
- (4) ステアリン酸マグネシウム1g、

この混合物を圧縮錠剤機により圧縮して、1錠あたり有効成分を40mg含有する錠剤100個を製造した。

【0067】

7. 製剤例4

BL2928株をホエー培地（0.5%酵母エキス、0.1%トリプチケースペプトン添加）で培養後遠心分離で菌体を回収した。この培養物1gを乳糖5gと混合し顆粒状に成形して顆粒剤を得た。

20

【0068】

8. BL2928株を含む食品の製造

(1) 飲料

洗浄菌体の凍結乾燥粉末をBL2928株が各々10⁸個以上含まれるように200mlの牛乳と混合して、本発明の予防改善治療剤入り飲料を得た。良好な風味を有していた。

【0069】

(2) 醗酵乳

BL2928株をヨーグルトミックス（生乳に2%脱脂乳を添加し、100、10分加熱した）に接種し、20で24時間培養した。紙カップに充填し冷却後、ヨーグルトとした製品中のBL2928株の生菌数濃度は、100gあたりは10⁸個以上であった。

30

【0070】

(3) 発酵バター

発酵バター	(wt/wt)
乳脂肪	96.8%
食塩	1.2
1. で得られた試料A	2

【0071】

(4) バターケーキ

バターケーキ	(wt/wt)
バター	24%
薄力粉	24
砂糖	24
全卵	24
2. で得られた試料(B)	4
香料	少々

40

【0072】

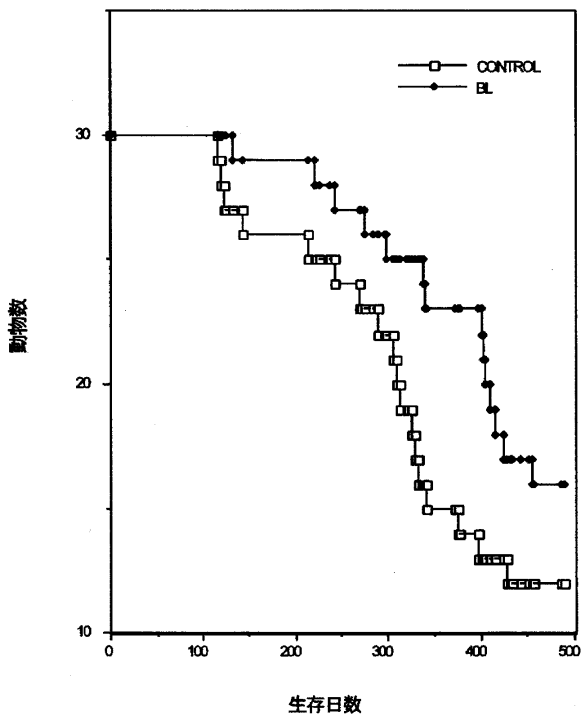
(5) マヨネーズ

マヨネーズ	(wt/wt)
サラダ油	65%

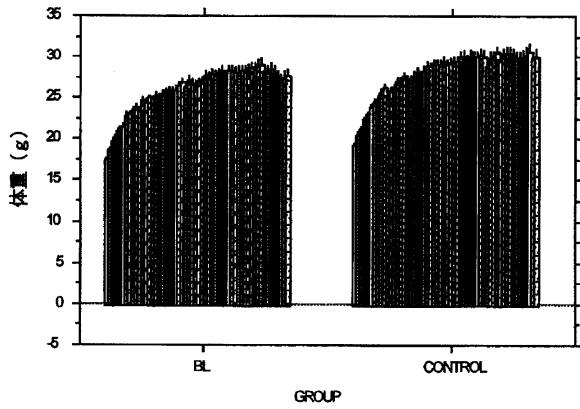
50

卵黄	17
食酢	10
1. で得られた試料 (A)	3
香辛料	4.4
グルタミン酸モノナトリウム	0.6

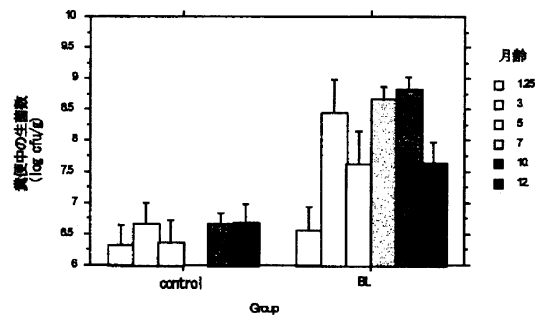
【図1】



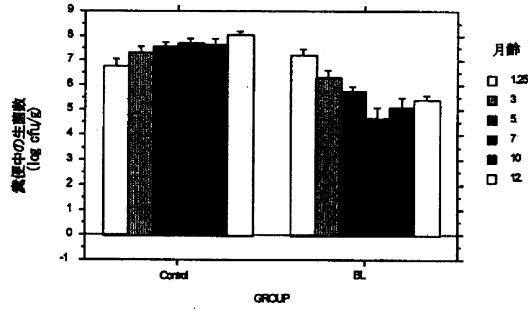
【図2】



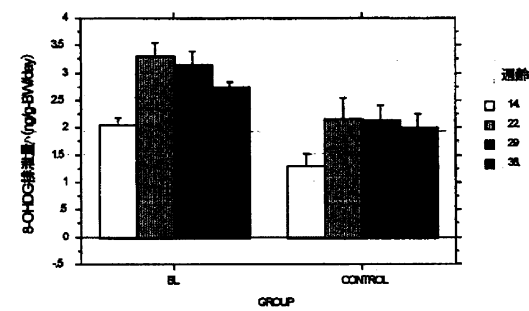
【図3】



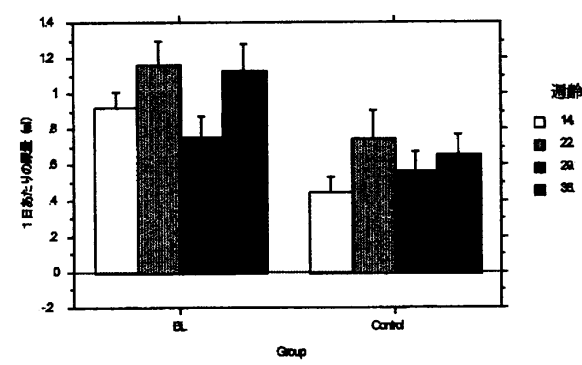
【 図 4 】



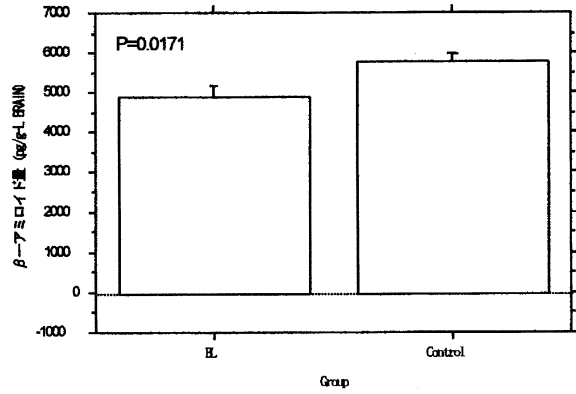
【 図 6 】



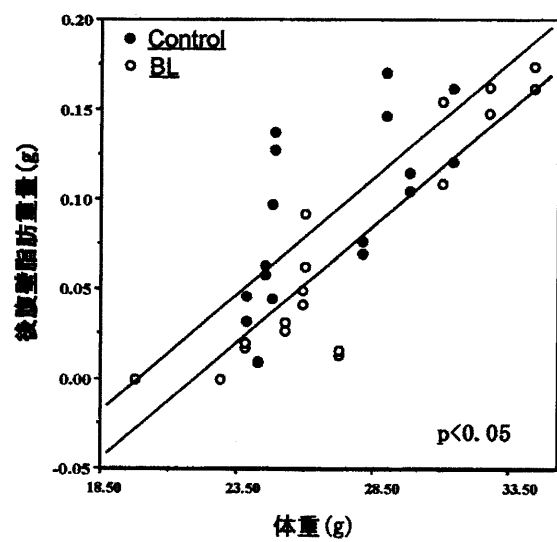
【 図 5 】



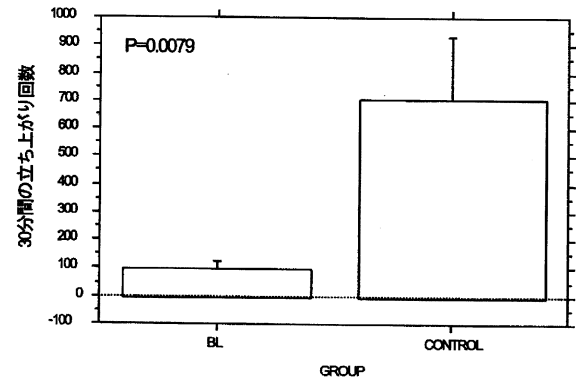
【 図 7 】



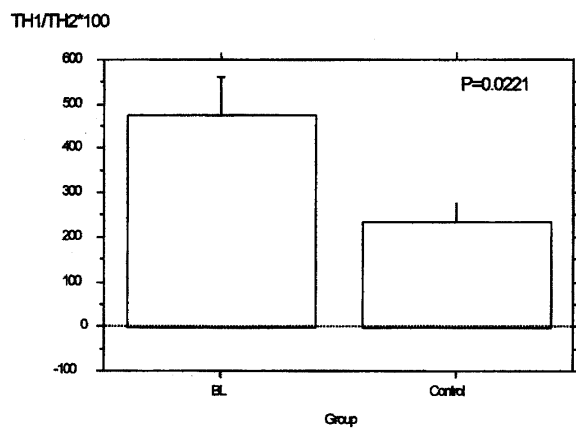
【 図 8 】



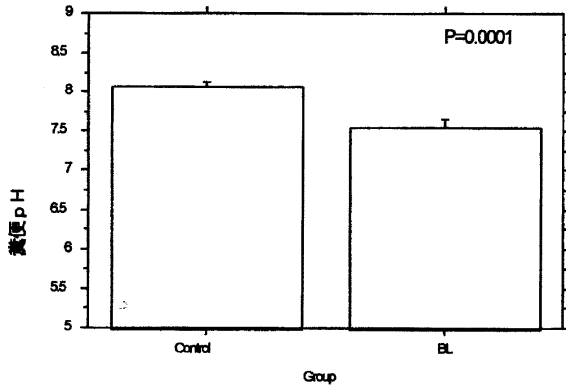
【 図 9 】



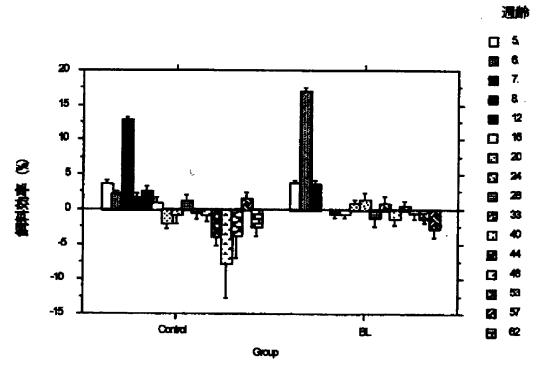
【 図 10 】



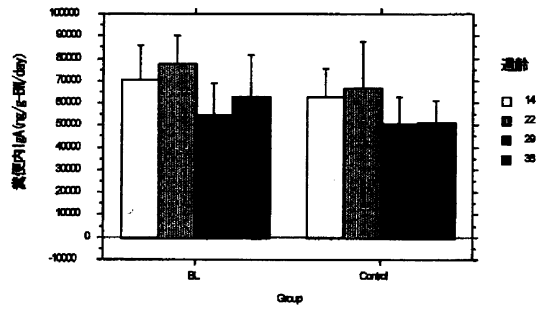
【 1 1 】



【 1 3 】



【 1 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 田中 博
東京都小平市花小金井南町2-18-3-507
- (72)発明者 鈴木 登志郎
静岡県浜松市三方ヶ原町1187
- (72)発明者 細川 昌則
京都府京都市左京区聖護院川原町53

審査官 上條 のぶよ

- (56)参考文献 特開昭62-258323(JP,A)
特開平06-056681(JP,A)
特開昭61-271223(JP,A)
特開2001-278794(JP,A)
特開平10-084909(JP,A)
特開平10-286078(JP,A)
Journal of Applied Microbiology, 2001年, Vol.90, No.1, p.43-52

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00-76
A23C 9/123
A23L 1/30
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)